

**Untersuchungen über die Antigenbindung  
an sensitive und nicht sensitive  
Lymphozyten in der Zellkultur**

von

**Norbert Knoblach**

aus

**Bamberg**

**1972**

1973 № 31



Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus der Abteilung für klinische Immunologie  
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg  
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

---

# **Untersuchungen über die Antigenbindung an sensitive und nicht sensitive Lymphozyten in der Zellkultur**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt  
von  
**Norbert Knoblach**  
aus  
**Bamberg**

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der

Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 10. 1972



Meinen lieben Eltern

in

Dankbarkeit gewidmet

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                  | Seite |
|--------------------------------------------------|-------|
| Einleitung                                       | 5     |
| Methodik und Material                            |       |
| Herstellung von $^{125}\text{J}$ -Thyreoglobulin | 6     |
| Erzeugung der experimentellen Immun-             |       |
| thyreoiditis                                     | 7     |
| Lymphozytenkulturen                              | 8     |
| Statistik                                        | 10    |
| Ergebnisse                                       | 10    |
| Diskussion                                       | 16    |
| Literatur                                        | 19    |

Die Bindung von Antigen an Lymphozyten sensibilisierter und nicht sensibilisierter Tiere wurde in verschiedenen Untersuchungen (2,5,7,10,12,16) dargestellt. Es wurden Antigene verwendet, die an fluoreszierende Farbstoffe oder an Marker-Enzyme gekoppelt waren, oder es wurden Lymphozyten mit radioaktiv markierten Antigenen inkubiert und die Antigen bindenden Zellen durch Autoradiographie ermittelt. In einer Population nicht sensitiver Lymphozyten waren weniger als 1 % der Zellen markiert, während der Anteil markierter Zellen bei sensibilisierten Tieren mehr als 10 % betragen kann (12).

In unseren Untersuchungen wurde die Kinetik der Antigenbindung in Lymphknotenzellkulturen während eines Inkubationszeitraumes von 6 bis 72 Stunden verfolgt. Es wurde verglichen, inwieweit Lymphknotenzellen sensibilisierter und nicht sensibilisierter Meerschweinchen in der Lage sind, radioaktiv markiertes Thyreoglobulin zu binden. Die Spezifität der Reaktion wurde durch Inhibition der Antigenbindung mit einem Überschuß an kaltem Antigen oder durch Inkubation mit Antiimmunglobulinseren geprüft.

## M E T H O D I K   U N D   M A T E R I A L

### HERSTELLUNG VON $^{125}\text{J}$ -THYREOGLOBULIN

Homologes Thyreoglobulin wurde aus Meerschweinchenschilddrüsen nach der Methode von DERRIEN et al. (3) hergestellt. Das gereinigte Thyreoglobulin wurde gefriergetrocknet. Es bildete bei der Immunelektrophorese unter Verwendung von Antimeerschweinchenserum vom Kaninchen eine einzelne Präzipitations-

linie im  $\alpha_2$ -Globulin-Bereich.

Das Thyreoglobulin wurde nach der Methode von GREENWOOD und HUNTER (8) markiert. 10  $\mu$ g Thyreoglobulin gelöst in 0,05 ml Phosphatpuffer pH 7,5 und 100  $\mu$ g Chloramin T wurden zu 2 mCi Na  $^{125}$ J hinzugegeben. Das markierte Reaktionsprodukt wurde auf einer G-50-Sephadex-Säule getrennt. Der erste Gipfel im Eluat enthielt 42,7 % der Radioaktivität. Bei der Papierelektrophorese zeigte das radioaktiv markierte Material die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie kaltes Thyreoglobulin.

#### ERZEUGUNG DER EXPERIMENTELLEN IMMUNTHYREOIDITIS

0,5 mg Thyreoglobulin gemischt mit 0,5 ml komplettem Freund-Adjuvans wurden in die vier Pfötchen von 17 Pirbright-Meerschweinchen (durchschnittliches Körpergewicht 200 g) injiziert. 10 Kontrolltiere wurden nur mit Freund-Adjuvans behandelt. 12 - 14 Tage danach wurden die Tiere getötet. Die Schilddrüsenhistologie der gegen Thyreoglobulin sensibilisierten Meer-

schweinchen bot in 45 % das typische Bild einer Immunthyreoiditis. Etwa die Hälfte der Tiere zeigte im Serum Antikörper bis zu einem Titer von 1:128, der durch die Technik der passiven Hämagglutination bestimmt wurde.

#### LYMPHOZYTENKULTUREN

Zur Herstellung von Zellkulturen wurden die inguinalen, axillaren und zervikalen Lymphknotenzellen der sensibilisierten Tiere und der Kontrolltiere unter sterilen Bedingungen präpariert.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden in 3 ml MEM (minimal essential medium) Eagles mit 10 % hitzeinaktiviertem Meer-schweinchenserum kultiviert. Zu den Kulturen wurden 0,1 ml bzw. 0,01 ml  $^{125}\text{J}$ -markiertes Thyreoglobulin, entsprechend 2,5  $\mu\text{Ci}$  bzw. 0,25  $\mu\text{Ci}$ , zugegeben. Zur Inhibition der Bindung markierten Antigens wurden Kulturserien mit zusätzlich 100  $\mu\text{g}$  kaltem Thyreoglobulin oder mit 0,3 ml Antiserum gegen Meer-schweinchen-Immunglobulin inkubiert. 6, 24, 48 und 72 Stunden

später wurden Autoradiogramme der Kulturen hergestellt:

Die Zellsuspension wurde gewaschen und in einer Lösung von 3 Teilen Äthanol und 1 Teil Eisessig fixiert; die Zellen wurden auf einem Objektträger ausgestrichen. Die Autoradiogramme wurden nach der Filmstrippingmethode unter Verwendung von Kodakfilmen Typ AR 10 angefertigt. Nach einer Expositionszeit von 48 bis 72 Stunden wurden die Präparate entwickelt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop durch Auszählung solcher morphologisch intakten Zellen, die mindestens den 3-fachen Background-Count an Granula aufwiesen.

In parallelen Untersuchungen wurde bei den Lymphknotenzellkulturen der sensibilisierten Tiere und der Kontrolltiere der Lymphozytentransformationstest durchgeführt. Hierbei wurden jeweils eine Serie von Zellkulturen mit  $10\text{ }\mu\text{g}$  Thyreoglobulin und eine weitere Serie ohne Zusatz inkubiert. Nach 12, 36 und 60 Stunden wurde den Kulturen für 12 Stunden  $5\text{ }\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin zugesetzt und die Tritiumaufnahme der Zellen in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

## STATISTIK

Die statistische Auswertung erfolgte nach den üblichen Gesichtspunkten. Die Signifikanzberechnungen wurden nach dem Student-(t)-Test durchgeführt; bei Errechnung eines  $p \leq 0,01$  wurde eine Signifikanz angenommen (4).

## ERGEBNISSE

Die Kinetik der Antigen bindenden Zellen bei sensibilisierten und nicht sensibilisierten Meerschweinchen ist in Tabelle 1 zusammengefaßt und in Abb. 2 aufgezeichnet. Die Anzahl markierter Zellen war bei den Zellkulturen von sensibilisierten Tieren in den ersten 48 Stunden signifikant größer als bei den Kontrollkulturen ( $p < 0,01$ ). Nach einer Kultivierung für 72 Stunden waren die Unterschiede wegen der steigenden Anzahl Antigen bindender Zellen in den Kulturen nicht sensitiver Lymphknotenzellen nicht mehr statistisch signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ). Es muß jedoch in Betracht gezogen werden,

daß nach 72 Stunden mehr als 50 % der zu Beginn der Kultivierung vorhandenen Zellen nicht mehr morphologisch intakt erscheinen.

Die Antigenaufnahme durch sensitive Zellen wurde fast vollständig durch Inkubation mit einem Überschuß an kaltem Thyreoglobulin gehemmt (siehe Tabelle 1 und Abb. 2). Inkubation von sensitiven Lymphknotenzellen mit einem Antiserum gegen Meerschweinchen-Immunglobulin reduzierte die Anzahl markierter Zellen in allen Proben auf einen Wert von unter 1 %.

Die Kinetik der Lymphozytentransformation steht im Gegensatz zur Kinetik der Antigenbindung. Nach 24 und 48 Stunden wurde keine Zunahme der DNS-Synthese gemessen, während nach Kultivierung mit dem Antigen für 72 Stunden der Stimulationsindex (cpm bei mit Thyreoglobulin inkubierten Kulturen zu cpm bei Kulturen ohne Thyreoglobulinzusatz) bei Lymphknotenzellkulturen von 10 sensibilisierten Tieren als  $3,1 \pm 0,4$  bestimmt wurde. Bei den von nicht sensibilisierten Kontroll-

tieren gewonnenen Kulturen betrug der durchschnittliche Stimulationsindex nach 72-stündiger Kultivierung  $1,2 \pm 0,3$ . Eine morphologische Untersuchung zeigte deutliche Unterschiede in der Verteilung der Radioaktivität über die markierten Zellen: Sensitive Zellen, die kurze Zeit mit dem markierten Thyreoglobulin inkubiert worden waren, wiesen eine Lokalisation von Granula an umschriebenen Zellbestandteilen auf, während nach länger dauernder Inkubation die Radioaktivität homogen über die Zelloberfläche verteilt war.

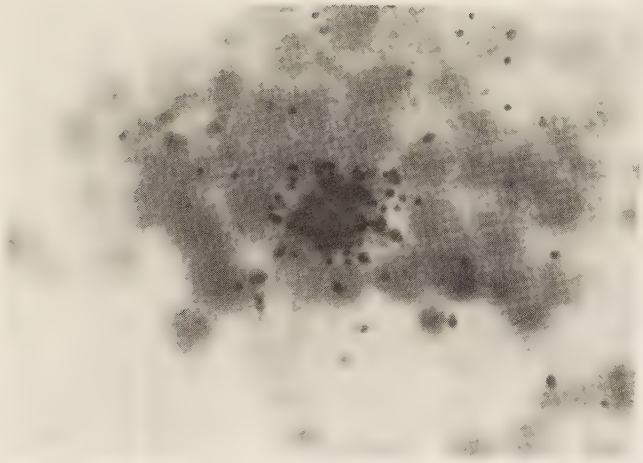


Abb. 1: Autoradiogramm einer Antigen bindenden Lymphknoten-  
zelle nach Inkubation mit  $^{125}\text{J}$ -Thyreoglobulin

| Meerschweinchen<br>sensibilisiert mit | Thyreoglobulin + FA<br>(17 Meerschweinchen)         | FA<br>(10 Meerschweinchen)                          |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Lymphozyten<br>inkubiert mit          | <sup>125</sup> J-Thyreoglobulin<br>+ Thyreoglobulin | <sup>125</sup> J-Thyreoglobulin<br>+ Thyreoglobulin |
| 6 h                                   | 5,6 ± 2,1                                           | 0,6 ± 0,6                                           |
| 24 h                                  | 8,1 ± 4,5                                           | 1,8 ± 1,1                                           |
| 48 h                                  | 12,3 ± 6,3                                          | 3,8 ± 3,1                                           |
| 72 h                                  | 11,9 ± 8,0                                          | 5,9 ± 2,8                                           |
|                                       |                                                     | 0,5 ± 0,3                                           |
|                                       |                                                     | 0,4 ± 0,2                                           |
|                                       |                                                     | 0,6 ± 0,4                                           |
|                                       |                                                     | 0,6 ± 0,5                                           |

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zahl Antigen bindender

Zellen in % von sensibilisierten und nicht sensibilisierten

Meerschweinchen bei Inkubation mit <sup>125</sup>J-markiertem Thyreoglobulin.

Zur spezifischen Inhibition wurden den Kulturen 100 µg kaltes

Thyreoglobulin zugesetzt.

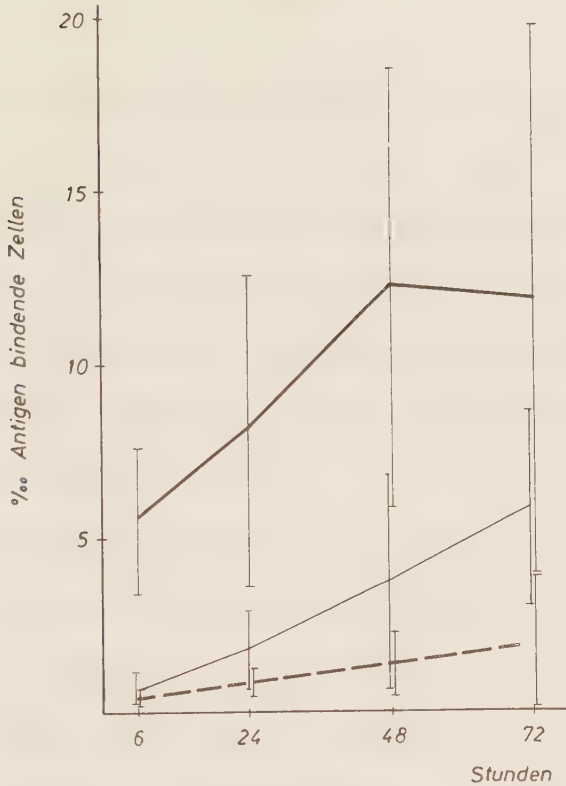


Abb. 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zahl Antigen bindender Zellen in % von sensibilisierten Meerschweinchen (—) und nicht sensibilisierten Meerschweinchen (---) bei Inkubation mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem Thyreoglobulin sowie in Zellkulturen sensibilisierter Meerschweinchen bei Inkubation mit  $^{125}\text{J}$ -Thyreoglobulin und Überschuß an kaltem Thyreoglobulin (·····).

## DISKUSSION

Bei den Antigen-spezifischen Rezeptoren der Zellmembranen handelt es sich um Immunglobuline (1,6,12-15). Die Reaktion von Immunglobulinen mit Antigenen kann durch Antiimmunglobuline gehemmt werden. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Fab-Fragmente der Rezeptoren anscheinend zur Außenseite hin orientiert sind. Die zellständigen Immunglobuline sind spezifische Antikörper, wie durch verschiedene Techniken wie Immunadhärenz (9,11), Bindung radioaktiver Antigene (2,5,7,10) etc. bewiesen wurde. Die Zahl der Antigen-reaktiven Zellen ist bei nicht sensibilisierten Tieren niedrig und nimmt während der Sensibilisierung zu (11).

Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine Inkubation von Zellkulturen mit Antigenen eine Zunahme von Antigen-reaktiven Zellen besonders während der ersten 24 Stunden hervorruft. Die Tatsache, daß die Bindung von radioaktivem Antigen durch Überschuß an kaltem Antigen gehemmt werden kann, beweist die Spezifität der Reaktion. Die Inhibition der Antigenbindung

durch Anti-Meerschweinchen-Immunglobulin unterstützt die These, daß der Rezeptor Immunglobulinnatur besitzt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Ergebnisse der Fixation von Antigen-Antikörper-Komplexen zuzuschreiben sind, die durch Reaktion von Antigenen mit Immunglobulinen entstanden sind, die von den Zellen in das Kulturmedium freigesetzt wurden.

Es ist bemerkenswert, daß die Zunahme Antigen-reaktiver Zellen nicht mit der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Aufnahme in den mit Thyreoglobulin inkubierten Kulturen der gleichen Zellen parallel läuft. Die DNS-Synthese ist in den Kulturen sensitiver Lymphknotenzellen vor Ablauf von 72 Stunden nicht signifikant gesteigert. Die Kinetik der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Aufnahme in diesen Kulturen ist eher der Kinetik der Antigenbindung in Experimenten ähnlich, bei denen Lymphknotenzellen nicht sensibilisierter Tiere verwendet wurden.

Das Phänomen der verzögerten Zunahme Antigen bindender Zellen bei den Kontrollkulturen könnte als in-vitro-Sensi-

bilisierung von Lymphknotenzellen interpretiert werden.

Die Spezifität der Reaktion wurde durch ihre Inhibition

mit einem Überschuß an kaltem Thyreoglobulin bewiesen.

L I T E R A T U R

1. Bankhurst, A.D., and N.L. Warner:

Surface immunoglobulins on mouse lymphoid cells.

J. Immunol. 107, 368 (1971).

2. Byrt, P., and G.L. Ada:

An in vitro reaction between labelled flagellin or haemocyanin and lymphocyte-like cells from normal animals.

Immunology, 17, 503 (1969).

3. Derrien, Y., R. Michel et J. Roche:

Recherches sur la préparation et les propriétés de la thyroglobuline pure.

Biochim. biophys. Acta (Amst.), 2, 454 (1948).

4. Documenta Geigy. Wissenschaftliche Tabellen 1960.

5. Dwyer, J.M., and I.R. Mackay:

Antigen-binding lymphocytes in human blood.

Lancet 1, 164 (1970).

6. Greaves, M.F., G. Torrigiani and I.M. Roitt:

Blocking of the lymphocyte receptor site for cell mediated hypersensitivity and transplantation reactions by anti-light chain sera.

Nature 222, 885 (1969).

7. Humphrey, J.H.:

Receptors on lymphocytes.

In: Immunopathology. Ed. P.A. Miescher, Vol. 6, p. 19.

Schwabe Basel/Stuttgart 1971.

8. Hunter, W.M.:

The preparation of radioiodinated proteins of high activity, their reaction with antibody in vitro: the radioimmunoassay.

In: Handbook of experimental Immunology, Ed. D.M. Weir, p. 608, Blackwell Sci. Publ., Oxford and Edinburgh, 1967.

9. Mäkelä, O., and G.J.V. Nossal:

Bacterial adherence: a method for detecting antibody production by single cells.

J. Immunol. 87, 447 (1961).

10. Noar, D., and D. Sulitzeanu:

Affinity of radioiodinated bovine serum albumin for lymphoid cells. Binding of  $J^{125}$ -BSA to lymphoid cells of immune mice.

Isr. J. Med. Sci. 5, 217 (1969).

11. Nota, N.R., M. Liacopoulos-Briot, C. Stiffel and G.

Biozzi:

L' immunocyto-adhérence: Une méthode simple et quantitative pour l' étude in vitro des cellules productrices d' anticorps.

C.R.H. Acad. Sci. Ser. D. 259, 1277 (1964).

12. Pernis, B., L. Forni and L. Amante:

Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes.

J. exp. Med. 132, 1001 (1970).

13. Rabellino, E., S. Colon, H.M. Grey and E.R. Unanue:

Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation.

J. exp. Med. 133, 156 (1971).

14. Raff, M.C., M. Sternberg and R.B. Taylor:

Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells.

Nature (London) 225, 553 (1970).

15. Sulitzeanu, D.,:

Affinity of antigen for white cells and its relation to the induction of antibody formation.

Bact. Rev. 32, 404 (1968).

16. Warnatz, H., F. Scheiffarth, F. Wolf, J. Reuther und R. Sparrer:

Untersuchungen über die Wirkung von Thyreoglobulin auf Lymphocyten in vitro.

Z. ges. exp. Med. 152, 130 (1970).

Herrn Prof. Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Es ist mir ein besonderes Anliegen, Herrn Priv.-Doz. Dr. Warnatz, der mir immer mit Rat und Tat entscheidend zur Seite stand, meinen Dank auszusprechen.

Für die freundliche Mitarbeit bedanke ich mich herzlichst bei Herrn E. Rückert.

## L E B E N S L A U F

Ich, Norbert Knoblach, wurde am 1. 11. 1943 als erstes von drei Kindern des Elektromeisters Sebastian Knoblach und seiner Ehefrau Johanna, geb. Höhle, in Bamberg geboren und römisch-katholisch getauft.

Vom Jahre 1949 bis 1953 besuchte ich die Kunigundenschule Bamberg und anschließend die Oberrealschule Bamberg, wo ich am 18. 7. 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Nach dem Studium von einem Semester Rechtswissenschaft im Wintersemester 1962/63 studierte ich an der Universität Erlangen-Nürnberg Medizin. Am 2. November 1965 legte ich die ärztliche Vorprüfung und am 30. Juli 1969 die ärztliche Prüfung mit dem Urteil "sehr gut" ab.

Ich heiratete am 12. 9. 1969.

Als Medizinalassistent war ich von Dezember 1969 bis Mai 1970 an der Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg und anschließend ein halbes Jahr an der Chirurgischen Klinik der Krankenhaus-

stiftung Bamberg tätig. Am 7. 12. 1970 erhielt ich die  
Approbation als Arzt. Seit Januar 1971 arbeite ich als  
Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik der Kranken-  
hausstiftung Bamberg.





## **Offsetdruck-Fotodruck**

---

**J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990**